

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

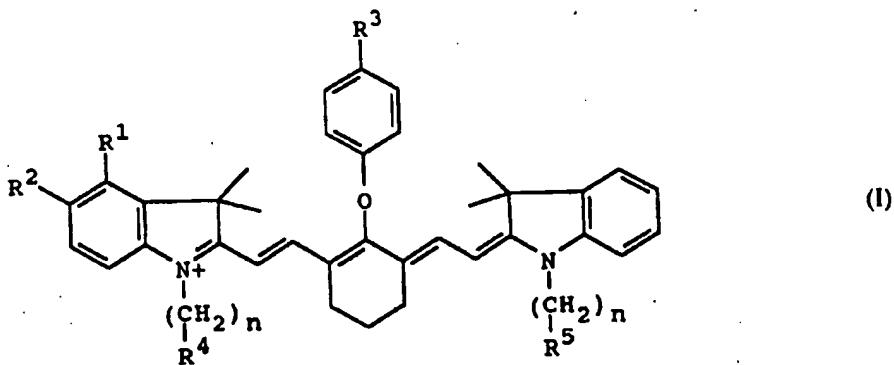


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: C07H 19/10, 19/20, C07F 9/572, C12Q 1/68, C07H 21/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/04747 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Februar 1995 (16.02.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/02541		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1994 (30.07.94)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(30) Prioritätsdaten: P 43 26 466.2 6. August 1993 (06.08.93) DE		
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): MUEHLECKER, Klaus [DE/DE]; Römerstrasse 7, D-82398 Polling (DE). HOELTKE, Hans-Joachim [DE/DE]; Haydnstrasse 5, D-82327 Tutzing (DE). BIRKNER, Christian [DE/DE]; Willingstrasse 9, D-82449 Uffing (DE). VON DER ELTZ, Herbert [DE/DE]; In der Au 21, D-82362 Weilheim (DE).		
(74) Anwälte: FOUQUET, Herbert usw.; Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim (DE).		

(54) Title: INFRA-RED DYE-LABELLED NUCLEOTIDES AND THEIR USE IN NUCLEIC ACID DETECTION

(54) Bezeichnung: INFRAROT-FARBSTOFF-MARKIERTE NUCLEOTIDE UND IHRE VERWENDUNG IN DER NUCLEINSÄURE-DETEKTION



(57) Abstract

Nucleoside-5' triphosphates and phosphoramidites bearing in the base section or on the phosphorus atom a radical absorbent in the long wavelength, preferably a carbocyanine group of the general formula (I), in which R¹ and R² are hydrogen or together form a phenyl radical; R³ is hydrogen if the bond with the nucleotide passes via the R⁴ position, or an -NCH₂- group if the bond with the nucleotide passes via the R³ position; R⁴ together with R⁵ or R⁵ alone represent an alkylsulphonyl group with n between 3 to 5 or R⁴ is an -NHCS- group with a number of 3 to 8. The invention also relates to the use of the compounds for labelling, detecting and sequencing nucleic acids.

(57) Zusammenfassung

Nucleosid-5'-triphosphate und Phosphoramidite, die am Basenteil bzw. am Phosphoratom einen im langwelligen absorbierenden Rest, vorzugsweise eine Carbocyanin-Gruppe der allgemeinen Formel (I) tragen, worin R¹ und R² jeweils Wasserstoff bedeuten oder zusammen einen Phenylrest bilden; R³ Wasserstoff bedeutet für den Fall, daß die Verknüpfung mit dem Nucleotid über die R⁴-Position erfolgt, oder eine -NHCS-Gruppe bedeutet, für den Fall, daß die Verknüpfung mit dem Nucleotid über die R³-Position erfolgt; R⁴ und R⁵ jeweils oder R⁵ alleine eine Alkylsulfonyl-Gruppe mit n zwischen einer Zahl von 3 bis 5 oder R⁴ eine -NHCS-Gruppe mit einer Zahl von 3 bis 8 darstellen, sowie die Verwendung der Verbindungen zur Markierung, Detektion und Sequenzierung von Nucleinsäuren.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Ireland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CZ	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Infrarot-Farbstoff-markierte Nucleotide und ihre Verwendung in der Nucleinsäure-Detektion

Die Erfindung betrifft Nucleosid-5'-triphosphate und Phosphoramidite, die am Basenteil bzw. am Phosphoratom einen im Langwelligen absorbierenden fluoreszierenden Rest, vörzugsweise eine Carbocyanin-Gruppe tragen, sowie deren Verwendung zur Markierung, Detektion und Sequenzierung von Nucleinsäuren.

Nucleinsäuren haben als Träger bzw. Überträger der genetischen Information eine zentrale Bedeutung in der belebten Natur. Sie haben deshalb seit ihrer Entdeckung durch F. Miescher das breite Interesse der Naturwissenschaften erregt und zur Aufklärung ihrer Funktion, Struktur und Wirkungsweise geführt. Mit der zunehmenden Kenntnis dieser grundlegenden molekularbiologischen Mechanismen ist es in den letzten Jahren möglich geworden, die Neukombination von Genen zu betreiben. Diese Technologie eröffnet z. B. neue Möglichkeiten in der medizinischen Diagnose und Therapie und in der Pflanzenzüchtung.

Ein wesentliches Werkzeug zur Erklärung dieser Zusammenhänge und der Lösung der Probleme war und ist der Nachweis der Nucleinsäuren und zwar sowohl was ihren spezifischen Nachweis betrifft, als auch was ihre Sequenz, also ihre Primärstruktur angeht.

Die spezifische Nachweisbarkeit von Nucleinsäuren beruht auf der Eigenschaft dieser Moleküle, mit anderen Nucleinsäuren durch Ausbildung von Basenpaarungen über Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung zu treten, zu "hybridisieren". In geeigneter Weise markierte, d. h. mit Indikatorgruppen versehene Nucleinsäuren ("Sonden") können so zum Nachweis komplementärer Nucleinsäuren ("target") eingesetzt werden.

Die Ermittlung der Primärstruktur ("Sequenz"), also der Abfolge der heterocyclischen Basen einer Nucleinsäure geschieht mittels den Techniken der "Sequenzierung". Diese Kenntnis der Sequenz ist wiederum die Grundvoraussetzung für einen gezielten und spezifischen Einsatz von Nucleinsäuren in molekularbiologischen Fragestellungen und Arbeitstechniken. Auch die Sequenzierung bedient sich letztlich des Prinzips der spezifischen Hybridisierung von Nucleinsäuren untereinander. Dabei werden wie oben erwähnt ebenfalls markierte Nucleinsäure-Fragmente verwendet.

Aus dem Gesagten wird deutlich, daß die geeignete Markierung von Nucleinsäuren eine unverzichtbare Voraussetzung jeglicher Nachweismethode ist.

- 2 -

Schon frühzeitig wurde dafür vor allem die radioaktive Markierung mit geeigneten Isotopen, wie ^{32}P oder ^{35}S eingesetzt. Die Nachteile der Verwendung radioaktiver Reagentien liegen jedoch klar auf der Hand: entsprechende Arbeiten bedürfen spezieller räumlicher Einrichtungen und Genehmigungen, sowie einer kontrollierten und aufwendigen Entsorgung des radioaktiven Abfalls. Die Reagentien zur radioaktiven Markierung sind teuer. Eine längere zeitliche Aufbewahrung derart markierter Proben ist wegen der kurzen Halbwertszeit obiger Nuklide nicht möglich.

Es hat daher in den letzten Jahren nicht an Versuchen gefehlt, diese gravierenden Nachteile zu umgehen, d. h. von einer radioaktiven Markierung wegzukommen. Dabei sollte die hohe Sensitivität dieser Markierungsart möglichst beibehalten werden.

Hier sind in der Tat bereits große Fortschritte erzielt worden [siehe z. B. "Nonradioactive Labeling and Detection of Biomolecules", C. Kessler (Hrsg.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg 1992].

Als nicht-radioaktive Indikatormoleküle haben sich u. a. hauptsächlich Haptene (wie Biotin oder Digoxigenin), Enzyme (wie alkalische Phosphatase oder Peroxidase) oder Fluoreszenzfarbstoffe (wie Fluorescein oder Rhodamin) bewährt.

Obwohl die **Markierung mit Haptenen** wie z. B. Digoxigenin in den Empfindlichkeitsbereich der Radioaktivität reicht, ist ein der radioaktiven Markierung entsprechender direkter Nachweis Hapten-markierter Nucleinsäuren nicht möglich. Hier muß eine Detektionsreaktion nachgeschaltet werden, die beispielsweise über eine Antikörper-Reaktion erfolgt. Diese indirekte Detektion erfordert mehrere Schritte, d. h. mehr Zeit und finanziellen Aufwand. Da Proteine zur Nachweisreaktion eingesetzt werden, ist eine spezielle Behandlung der Festphase (Membranen, Mikrotiterplatten) durch Blockieren und Waschschrifte nötig, um eine unspezifische Bindung zu reduzieren. Dennoch ist die Sensitivität dieser Zweistufen-Detektion in der Regel durch Entstehen von störender Hintergrundfärbung aufgrund unspezifischer Proteinbindung limitiert. Für direkt enzymmarkierte Nucleinsäuren gilt prinzipiell dasselbe.

Den genannten Nachteil der oben geschilderten indirekten Detektion weist die Verwendung von Fluoreszenz-markierten Nucleinsäuren nicht auf. Ein direkter Nachweis durch Anregung der Fluoreszenz ist im Prinzip möglich und mit geeigneter Einrichtung (Fluoreszenz-Mikroskop, Scanner) sicht- und messbar. Auch hier stört jedoch die Autofluoreszenz von Zell- und Gewebekomponenten des zu untersuchenden biologischen Materials, wie Farbstoffe, Lipide, Proteine etc. Solche Störungen treten insbesondere auch

bei Einsatz von festen Trägermaterialien (z. B. Nylon-Membranen) durch deren Eigenfluoreszenz auf und erschweren oder verhindern den Nachweis.

Eine Lösung dieser Probleme bietet sich prinzipiell durch die Verwendung von Farbstoffen an, deren Excitation und Emmission in Wellenlängenbereichen über 680 nm, also im nahen Infrarot(NIR)-Bereich liegt.

Hier fallen die o. g. störenden Einflüsse nicht mehr ins Gewicht. Ein weiterer wesentlicher Vorteil besteht darin, daß zur Anregung billige Laserdioden mit hoher Lebensdauer verwendet werden können.

So ist z. B. die Technik der DNA-Sequenzierung nach Fluoreszenz-Markierung der DNA-Fragmente durch photoelektrische Messung mit einem Laser und einem Sensor Gegenstand einer Anmeldung (US 4,729,947). Dabei werden in an sich bekannter Weise nach dem sogenannten Sanger-Verfahren IR-Farbstoff-markierte Oligonucleotide als Primer eingesetzt, die dabei als Starter der Synthese des neuen, komplementären Nucleinsäurestranges fungieren.

Diese Methode hat aber den Nachteil, daß-abhängig von der zu sequenzierenden DNA- jeweils spezifische, d. h. eine Vielzahl von solchen markierten Primern immer wieder neu zu synthetisieren sind. Auch ist diese Synthese markierter oligomerer Primer mit hohem zeitlichem und finanziellem Aufwand verbunden, da erst das unmarkierte Oligonucleotid hergestellt werden muß und anschließend die Signal(Reporter)gruppe in einer zweiten Reaktion chemisch angebracht wird.

Es bestand daher die Aufgabe, Verbindungen herzustellen, die eine universelle, einfache und spezifische Markierung von Nucleinsäuren ermöglichen.

Nun ist bekannt, daß sich Nucleinsäuren durch den Einbau von entsprechend markierten Nucleosid-triphosphaten mit Polymerasen neu synthetisieren und damit markieren lassen. Auf dem Sektor der Desoxyribonucleinsäuren (DNA) geschieht dies durch DNA-Polymerasen nach den Methoden der "nick translation" [Rigby, P. W. et al. (1977) J. Mol. Biol. 113, 237] und des "random primed labeling" [Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1984) Anal. Biochem. 137, 266] durch den Einbau von Desoxy-nucleotiden, im Falle der Ribonucleinsäuren durch RNA-Polymerasen und Ribonucleotiden im Sinne einer Transcription. Eine weitere Methode der Markierung von Nucleinsäuren ist über eine sogenannte "3'-tailing"-Reaktion mit Hilfe von Terminaler Transferase und Ribo- bzw. Desoxyribonucleosid-triphosphaten möglich.

Mit Indikatormolekülen versehene Nucleosid-triphosphate wie Fluorescein oder Digoxigenin (MW 332 bzw. 390) werden jedoch -im Vergleich zu ihren natürlichen

- 4 -

Substraten - von Polymerasen nur noch relativ schlecht als Substrate akzeptiert und in die neusynthetisierte Nucleinsäure eingebaut (Hoeltke, H.-J. et al. (1990) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371, 929).

Es war daher nicht zu erwarten, daß Indikatormoleküle mit noch deutlich höheren Molekulargewichten (800-1000) von Polymerasen als Substrate angenommen und in Nucleinsäuren eingebaut werden würden. Es war noch weniger zu erwarten, daß diese Moleküle mit der gegebenen räumlich anspruchsvollen Struktur infolge starker sterischer Hinderung von Polymerasen umgesetzt werden würden.

Überraschend wurde nun gefunden, daß mit Infrarot-Farbstoffen markierte Nucleosid-triphosphate von Polymerasen wie T7 DNA Polymerase als Substrate akzeptiert und in Nucleinsäuren eingebaut werden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind daher neu.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung bestand darin, eine Methode der Verwendung der oben genannten erfindungsgemäßen markierten Nucleotide zu finden, die es erlaubt, die damit markierten Nucleinsäuren direkt auf festen Trägern wie z. B. Nylon-Membranen oder in Lösung, z. B. in Mikrotiterplatten zu detektieren.

Wie oben bereits beschrieben, hat die Markierung von Nucleinsäuren mit Fluorophoren wie Fluorescein oder Tetramethylrhodamin den Nachteil, daß die Messung dieser Fluoreszenz durch die Eigenfluoreszenz des Trägermaterials gestört wird.

Werden nun aber die erfindungsgemäßen IR-Farbstoff-markierten Nucleosid-triphosphate zur Markierung der Nucleinsäuren verwendet, so fallen diese Störungen wegen der im nahen Infrarot-Bereich gelegenen Messwellenlängen nicht mehr ins Gewicht.

Die Vorteile einer Nucleinsäure-Detektion durch *in situ* Hybridisierung sind bekannt. Gewöhnlich werden dabei die markierten Proben oder Sonden entweder direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert oder aber im Falle der Hapten-Markierung über einen weiteren Verfahrensschritt in einer immunologischen Reaktion ("ELISA") nachgewiesen. Diese Sichtbarmachung geschieht in der Regel durch Fixierung der Proben an z. B. Nylonmembranen oder in flüssiger, homogener Phase in Mikrotiterplatten. Dieser zusätzliche Schritt ist mit höherem zeitlichem und finanziellem Aufwand verbunden. Es ist also wünschenswert, diesen Schritt wegfallen zu lassen.

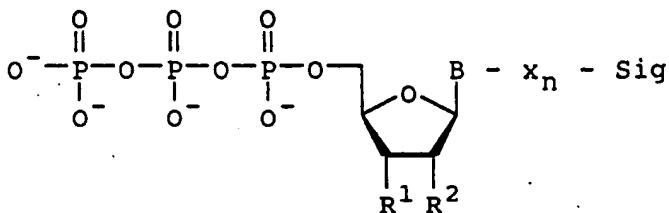
Durch die Möglichkeit der direkten Anregung der IR-Fluoreszenz-markierten Nucleinsäuren durch geeignete Laserdioden und die oben geschilderte Unempfindlichkeit der Detektion gegen Eigenfluoreszenz des Trägermaterials ist eine einfache und kostengünstige apparative

- 5 -

Ausstattung möglich. Die immunologische Nachweisreaktion kann entfallen. Der Nachweis der IR-markierten Nucleinsäure geschieht einfach optisch durch die Kombination Laser/Detektor mit Hilfe eines geeigneten Scanners oder Mikrotiterplatten -Readers.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Verwendung der erfindungsgemäßen mit Infrarot-Fluorophoren markierten Nucleosid-5'-triphosphate als Polymerase-Substrate den direkten enzymatischen Einbau in Nucleinsäuren ermöglichen und eine Detektion der so markierten Nucleinsäuren sowohl für Sequenzierungen, als auch durch eine in dieser Kombination ebenfalls neue und daher ebenfalls erfindungsgemäße *in situ* Hybridisierung zulassen.

Die erfindungsgemäßen Nucleosid-5'-triphosphate der allgemeinen Formel



werden hergestellt, indem in an sich bekannter Weise von unmodifizierten Nucleosiden ausgegangen wird, diese im Falle der Pyrimidinnucleoside Uridin, Thymidin und Cytidin bzw. der Purin-nucleoside Adenosin und Guanosin, sowie der diesen entsprechenden 7-Desaza-purin- und 7-Desaza-8-aza-purin-nucleoside in geeigneter Weise an C-5 oder C-6 (Pyrimidine), an C-8 (Purine), an C-8 (3-Desaza-purine) an C-7 oder C-8 (7-Desaza-purine) chemisch modifiziert und letztlich 5'-phosphoryliert.

Die modifizierende Gruppe besteht zweckmäßigerweise aus einem Abstandhalter geeigneter Länge (spacer), sowie einer terminalen primären oder sekundären Aminogruppe, die durch geeignete aktivierte Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. in Form der Isothiocyanate oder N-Hydroxysuccinimidester) substituierbar ist.

Soche Fluoreszenzfarbstoffe werden in aktiverter, d.h. mit z. B. Aminogruppen gut reagierender Form eingesetzt, vorzugsweise als Isothiocyanate. Nach erfolgter Reaktion sind die Fluorophore über NHCS-Gruppen an die modifizierende Gruppe des Nucleotides kovalent gebunden.

Die Phosphorylierung der so modifizierten Nucleoside erfolgt nach in der Literatur bekannten Verfahren [z. B. Yoshikawa, M. et al. (1967) Tetrah. Lett. 50, 5065] durch

- 6 -

Umsetzung mit Phosphoroxidtrichlorid zum Monophosphat und anschließender Reaktion mit Pyrophosphorsäure zum gewünschten 5'-Triphosphat.

Alternativ ist auch eine direkte Modifizierung der präformierten Nucleosid-5'-triphosphate möglich.

Die Fluorophore sind Verbindungen, die im nahen Infrarot-Bereich absorbieren, d. h. zwischen 600 und 800 nm. Bevorzugt sind solche von 630 nm bis 780 nm, wie z. B. Carbocyanine.

Wie schon oben erwähnt ist für die Zwecke der Sequenzierung neben der oben geschilderten Methode des Einbaus von markierten Nucleosid-triphospaten mit Polymerasen auch ein weiteres Verfahren üblich, das sich der Verwendung von markierten Oligonucleotiden, sogenannten Primern bedient. Wie ebenfalls erwähnt, ist die übliche Synthese dieser Moleküle in einer mehrstufigen Reaktion sehr zeitaufwendig. Die Signalgruppe muß dabei nach abgeschlossener Oligonucleotidsynthese in einem Extra-Schritt am 5'-Ende des Oligomeren angebracht werden. Da die eigentliche Oligonucleotidsynthese in automatisch arbeitenden Synthesegeräten erfolgt, ist es in hohem Maße wünschenswert, daß der Schritt des Anbringens der Signalgruppe ebenfalls bereits im Synthesizer erfolgen kann. Da die genannte Oligonucleotid-Synthese in einem schrittweisen Anhängen von monomeren Bausteinen, sogenannten Nucleosid-phosphoramiditen besteht, war es eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein Fluorophor-phosphoramidit zu entwickeln, welches den direkten Einbau der Signalgruppe als letzten Schritt in der automatischen Oligonucleotidsynthese ermöglicht. Ein solches NIR-Farbstoff-phosphoramidit ist bislang nicht bekannt und daher erforderlich neu.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher:

Beispiel 1**5-(3-Aminoallyl)-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat**

Dieses Derivat wurde wie von Langer et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78, 6635 beschrieben hergestellt.

Beispiel 2**Anhydro-11-phenoxy-10,12-propylen-3,3',3'-tetramethyl-4,5-benzindotricarbocyanin-1-(4-sulfobutyl)-1'-(3-aminopropyl)-thiono-[5-(3-aminoallyl)-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat]**

Zu einer Lösung von 33 mg 5-Aminoallyl-dUTP-Li₄ (60 µmol) in 2 ml 0,1 m Na-boratpuffer, pH 8,5, wird eine Lösung von 50 mg Anhydro-11-phenoxy-10,12-propylen-3,3',3'-tetramethyl-4,5-benzindotricarbocyanin-1-(4-sulfobutyl)-1'-(3-aminopropyl)-thiono-[5-(3-aminoallyl)-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat]

Danach ist laut Papierelektrophorese

(0,05 m Na-Citrat-Puffer, pH 5) der größte Teil der Ausgangsmaterialien umgesetzt.

Zur Isolierung der gewünschten Substanz wird das Reaktionsgemisch mit ca. 50 ml Wasser verdünnt und die tiefgrün gefärbte Lösung auf eine Ionenaustrauschersäule mit DEAE-Sephadex A-25 in der Chloridform gegeben. Das Produkt wird mit einem linearen Gradienten von Wasser auf 1m LiCl von der Säule eluiert, die Produktfraktionen im Vakuum konzentriert und über eine "Reversed Phase"-Chromatographie an RP 18-Material entsalzt. Nach Lyophilisation erhält man 6 µmol (10 %) des gewünschten Triphosphates.

Spektrale Daten: Emission_{max} 786 nm, 720 nm (Schulter), 238 nm

Beispiel 3:**Anhydro-10,12-propylen-3,3',3'-tetramethyl-1,1'-bis (3-sulfobutyl)-indotricarbocyanin-11-(4-amino)phenoxy-thiono-[8-(5-aminopentylamino)-2'-desoxyadenosin-5'-triphosphat] ("IRD-dATP")**

Das Derivat wird nach dem unter Beispiel 2 angegebenen Verfahren aus 38 mg

- 8 -

8-Aminopentylamino-dATP (60 μ mol) und 50 mg Anhydro-10,12-propylen-3,3',3'-tetramethyl-1,1'-bis (3-sulfobutyl)-11-(4-isothiocyanato)phenoxy-indotricarbocyanin-Na-Salz (60 μ mol) hergestellt. Es wurden 3 μ mol der Verbindung erhalten.

Spektrale Daten: Emission Max. 770 nm, 697 nm (Schulter), 279 nm

Beispiel 4:

Einsatz von IRD-dATP als Substrat für T7-DNA-Polymerase

3 μ g Template DNA werden in einem Gemisch von 2 μ l Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl), 1 pM M13/pUC-Primer und 7 μ l H₂O 15 Min. bei 37 °C inkubiert.

Für die Markierungsreaktion werden 1 μ l DTT (100 mM), 2 μ l Markierungsmix (10 μ M IRD 40-dATP, je 1 μ M dCTP, dGTP und d TTP), 1 μ l H₂O und 2 μ l T7-DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l) zugegeben und bei RT 10 Min. inkubiert.

Zur Verwendung in der DNA-Sequenzierung erfolgt anschließend eine Terminationsreaktion durch Zugabe der Terminationsmixe (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP).

Beispiel 5:

Anhydro-11-phenoxy-10,12-propylen-3,3',3'-tetramethyl-4,5-benzindol-indotricarbocyanin-1-(4-sulfobutyl)-1'-(3-aminopropyl)-thiono-[5-(3-aminoallyl)-uridin-5'-triphosphat]

Die Verbindung wurde analog Beispiel 2 aus 5-Aminoallyl-UTP (nach Beispiel 1 hergestellt) und dem entsprechenden Isothiocyanat synthetisiert.

Die spektralen Daten entsprechen der 2'-Desoxy-Verbindung aus Beispiel 2.

Beispiel 6:

Anhydro-10,12-propylen-3,3',3'-tetramethyl-1,1'-bis (3-sulfobutyl)-indotricarbocyanin-11-(4-amino)phenoxy-thiono-[5-(3-aminoallyl)-2',3'-didesoxy-uridin-5'-triphosphat ("IRD -ddUTP")

- 9 -

1. Stufe: 2',3'-didesoxy-uridin-5'-triphosphat

Das Derivat wurde ausgehend von kommerziell erhältlichem 2',3'-Didesoxy-cytidin-5'-triphosphat (Boehringer Mannheim) durch Desaminierung mit NaNO₂/Essigsäure über das instabile Diazonium-Derivat synthetisiert.

2. Stufe: 5-(3-aminoallyl)-2',3'-didesoxy-uridin-5'-triphosphat

Die Verbindung wurde analog Beispiel 1 nach Langer et al. über das 5-Mercuri-Derivat des 2',3'-didesoxy-UTP hergestellt.

3. Stufe: "IRD-ddUTP"

Das Didesoxy-Derivat wurde entsprechend Beispiel 2 durch Umsetzung des 5-Aminoallyl-ddUTP mit dem entsprechenden Isothiocyanat erhalten

Die spektralen Daten entsprechen denen der 2'-Desoxy-Verbindung aus Beispiel 3

Beispiel 7:

Anhydro-10,12-propylen-3,3',3'-tetramethyl-1,1'-bis (3-sulfopropyl)-indotricarbocyanin-11-[(4-ethoxy)phenoxy-O-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl-phosphoramidit

In einem 50 ml Rundkolben werden 425 mg Anhydro-11-(4-hydroxyethyl)phenoxy-10,12-propylen-3,3',3'-tetramethyl-1,1'-bis (3-sulfopropyl)-indotricarbocyanin-hydroxid in Form des Na-Salzes (0,5 mmol) in 5 ml trockenem Acetonitril gelöst und dazu 0,275 ml Ethyl-diisopropylamin (1,6 mmol) gegeben. Anschließend tropft man unter Stickstoff und Rühren 0,125 ml Chlor-β-cyanoethoxy-N,N-diisopropylamino-phosphan innerhalb von ca. 3 Min. ein. Man röhrt weitere 30 Min. bei RT, fügt dann ca. 10 ml wässrige, 5%ige NaHCO₃-Lösung zu und extrahiert daraufhin 2x mit je ca. 10 ml Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na-Sulfat getrocknet, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand an Kieselgel mit dem Laufmittel Dichlormethan/Ethylacetat/Triethylamin 45:45:10 chromatographiert.

Die Ausbeute beträgt 480 mg = 88,7 % d. Th.

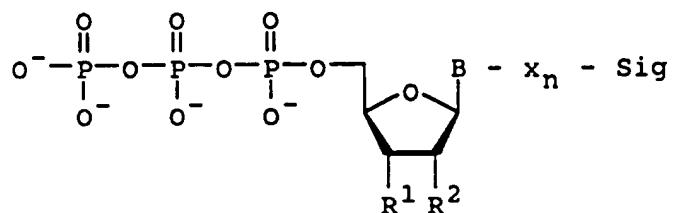
DC (Kieselgel, Fließmittel wie o. a.) R_f = 0,4

³¹P-NMR (d₆DMSO) : 149 und 153 ppm (2 Diastereomere)

- 10 -

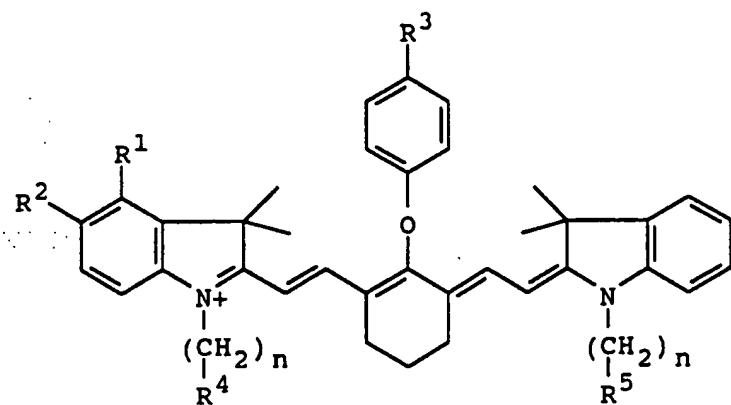
Patentansprüche

1. Nucleosid-5'-triphosphate der allgemeinen Formel



worin B die heterocyclischen Basen Adenin, Guanin, Hypoxanthin, 7-Desaza-adenin, 7-Desaza-guanin, 7-Desaza-hypoxanthin, 7-Desaza-8-aza-adenin, 7-Desaza-8-aza-guanin, 7-Desaza-8-aza-hypoxanthin, sowie Thymin, Cytosin und Uracil bedeutet,
 x eine verbindende Gruppe mit $n = 4-20$ Atomen,
 Sig ein Fluoreszenzmoleköl der Anregungswellenlänge 650-800 nm
 und R^1 und R^2 jeweils H und / oder OH darstellen.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, worin B die oben angegebene Bedeutung hat, x eine verbindende Gruppe mit vorzugsweise $n = 10-15$ Atomen darstellt,
 Sig ein Carbocyanin der allgemeinen Formel



darstellt, worin R_1 und $R_2 = H$ oder zusammen einen Phenylrest.

- 11 -

R_3 = H im Falle der Verknüpfung mit dem Nucleotid über die R_4 Position, bzw. -NHCS- im Falle der Verknüpfung über die R_3 Position,

R_4 und R_5 jeweils alkylsulfonyl mit $n = 3-5$ oder $R_4 = -NHCS-$ mit $n = 3-8$,

R_5 = alkylsulfonyl mit $n = 3-5$ im Falle der Verknüpfung über die R_4 Position bedeuten

3. Verbindungen nach den Ansprüchen 1 oder 2 und ihre Verwendung als Substrate für DNA-Polymerasen

4. Verbindungen nach den Ansprüchen 1 oder 2 und ihre Verwendung als Substrate für RNA-Polymerasen

5. Verwendung der Verbindungen nach den Ansprüchen 1 oder 2 zur Markierung von Nucleinsäuren

6. Verwendung der Verbindungen nach den Ansprüchen 1 oder 2 zum Nachweis von Nucleinsäuren

7. Verwendung der Verbindungen nach den Ansprüchen 1 oder 2 in der DNA-Sequenzierung

8. Verwendung der Verbindungen nach den Ansprüchen 1 oder 2, indem diese in der *in situ*-Hybridisierung eingesetzt werden

9. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 8, indem die Hybridisierung auf Membranen erfolgt

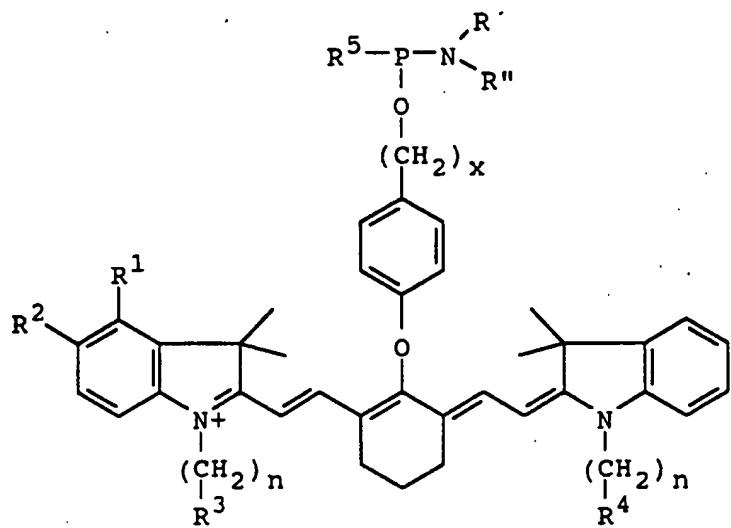
10. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 8, indem die Hybridisierung in Lösung durchgeführt wird

11. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 10, indem die Hybridisierung in Lösung in Mikrotiterplatten durchgeführt wird

12. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 6 indem die Detektion der markierten Hybride mittels entsprechender Laserdioden und Detektoren erfolgt

- 12 -

13. Verbindungen der allgemeinen Formel



worin R_1 und R_2 = H oder zusammen einen Phenylrest,
 R_3 und R_4 jeweils Alkylsulfonyl mit $n = 3-5$, R_5 = Methoxy oder 2-Cyanoethoxy und
 R und R'' jeweils Ethyl oder Isopropyl und $x = 1-10$ bedeuten

14. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 13 indem diese in der Oligonucleotid-synthese nach dem Phosphoramidit-Verfahren eingesetzt werden

15. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 14 zur 5'-Markierung von Oligonucleotiden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 94/02541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07H19/10 C07H19/20 C07F9/572 C12Q1/68 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07F C07H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 527 433 (MILES INC) 17 February 1993 see page 4, line 18 - line 43 ---	1
A	EP,A,0 359 225 (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 21 March 1990 see page 9 ---	13-15
A	WO,A,90 03383 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 5 April 1990 see claims; figure 1 ---	13-15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

1 Date of the actual completion of the international search

7 November 1994

Date of mailing of the international search report

16. 11. 94

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 LIV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Day, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/EP 94/02541

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY OF THE USSR. (ZHURNAL ORGANICHESKOI KHIMII), vol.57, 1992, NEW YORK US pages 4578 - 4580 STREKOWSKI ET AL 'Substitution Reactions of a Nucleofugal Group in Heptamethine Cyanin Dyes. Synthesis of an Isocyanato Derivative for Labeling of Proteins with a Near-Infrared Chromophore' see the whole document -----</p>	1,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Int'l Application No
PCT/EP 94/02541

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0527433	17-02-93	NONE		
EP-A-0359225	21-03-90	US-A-	4997928	05-03-91
		JP-A-	2174792	06-07-90
		US-A-	5262536	16-11-93
WO-A-9003383	05-04-90	AU-B-	618414	19-12-91
		AU-A-	4317989	18-04-90
		EP-A-	0436582	17-07-91
		JP-T-	4503403	18-06-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 94/02541

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07H19/10 C07H19/20 C07F9/572 C12Q1/68 C07H21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07F C07H C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP,A,0 527 433 (MILES INC) 17. Februar 1993 siehe Seite 4, Zeile 18 - Zeile 43 ----	1
A	EP,A,0 359 225 (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 21. März 1990 siehe Seite 9 ----	13-15
A	WO,A,90 03383 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 5. April 1990 siehe Ansprüche; Abbildung 1 ----	13-15
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siche Anhang Patentsfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

*'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

*'B' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist

*'L' Veröffentlichung, die gezeigt ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

*'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsatum veröffentlicht worden ist

*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

*'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentsfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

7. November 1994

16. 11. 94

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Day, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/02541

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY OF THE USSR. (ZHURNAL ORGANICHESKOI KHIMII), Bd.57, 1992, NEW YORK US Seiten 4578 - 4580 STREKOWSKI ET AL 'Substitution Reactions of a Nucleofugal Group in Heptamethine Cyanin Dyes. Synthesis of an Isocyanato Derivative for Labeling of Proteins with a Near-Infrared Chromophore' siehe das ganze Dokument -----</p>	1,13

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/02541

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0527433	17-02-93	KEINE		
EP-A-0359225	21-03-90	US-A-	4997928	05-03-91
		JP-A-	2174792	06-07-90
		US-A-	5262536	16-11-93
WO-A-9003383	05-04-90	AU-B-	618414	19-12-91
		AU-A-	4317989	18-04-90
		EP-A-	0436582	17-07-91
		JP-T-	4503403	18-06-92